

5.4.2 Cleavage and fractionation of genomic DNA (complete translation)

When sufficiently large genomic DNA is obtained, such DNA is randomly cleaved and fractionated to separate DNA molecules having lengths appropriate to be integrated into a vector (usually 15-20 kbp). To construct a complete gene library, random digestion of DNA is critical, and mechanical cleavage (shearing) or partial digestion with a couple of restriction enzymes that recognize four nucleotide sequence as a restriction site and generate blunt ends has been used. These methods, however, require a number of steps, such as treatment with enzymes, which reduce efficiencies. Thus, partial digestion with a single enzyme is often used as a simplified method. However, sequence regions might remain to be cloned even after complete digestion, since recognition sites for restriction enzymes do not occur in the genome in a completely random manner (e.g. highly frequent repetitive sequence regions). Special care should be taken when restriction enzymes recognizing a particular six-base site are used. It may necessitate combined use of different libraries constructed by using another restriction enzyme. Recently, vectors that have various BamHI sites were developed (other several enzymes also can be used for the vectors, since they have a poly-linker site), which has resolved the problems above by utilizing cleavage with four-base cutter MboI or Sau3AI which can generate a BamHI site. The following is an exemplary use of partial digestion with a single enzyme for generating a gene library.

日本生化学会編
新生化学実験講座

2

核 酸 Ⅲ
組換えDNA技術

東京化学同人

編集担当

村 松 正 実
西 村 邇 满
高 浪 瞳 夫
閔 口 瞳

新生化学実験講座 2

第1版 第1刷 1992年10月5日 発行

核 酸 III

—組換えDNA技術—

© 1992

編 集 社団法人 日本生化学会

発行者 小澤美奈子

発 行 株式会社東京化学同人
東京都文京区千石3丁目36番7号
電話 03-3946-5311・FAX 03-3946-5316

印 刷 大日本印刷株式会社
製 本 株式会社松岳社

ISBN4-8079-1073-6
Printed in Japan

2. 組換え DNA 実験に用いる酵素

当然ながら反応液の体積が少ないので、つまり酵素と dNTP の濃度が高いほど効率がよいといえる。

以上のような注意をはらっても長い mRNA について全長 cDNA を合成することが難しいことが多い。原因の一つとして、鑄型 RNA 自体が高次構造を形成することにより反応の進行が止まることがあげられる。95°Cで加熱急冷して比較的高温(44°C)で反応を行うとか¹⁾、メチル水銀で前処理する²⁾などの工夫がされている。しかし RNA 高次構造の融解温度は DNA の場合よりもかなり高いので、RNA が安定なヘアピン構造を形成する場合には効果が期待できない。長い mRNA の解析に当たっては、まず通常 poly(A) 領域から作製した cDNA について分析し、つぎに、得られた 5' 末端の方法で poly(A) 領域から作製した cDNA について分析し、つぎに、得られた 5' 末端付近の配列をプローブとして、ランダムプライマーを用いて作製した cDNA ライブリー探索し、さらに上流の配列をもつクローンを分析したり、PCR 法を適用して 5' 末端から上流の配列を增幅し分析する、などの作戦が必要となる。

2.4 DNA の修飾に用いる酵素

制限酵素切断により調製した DNA 断片や逆転写酵素で合成した cDNA をクローン化するには構造改変が必要である。使用するおもな酵素は、DNA ポリメラーゼ、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdTase)、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、などである。

2.4.1 DNA ポリメラーゼ³⁾

すべての生物は固有の DNA ポリメラーゼを生産しており、その種類は多種多様であるが、遺伝子工学に用いられているのは、主として大腸菌 DNA ポリメラーゼとその誘導体であるクレノウ酵素、大腸菌ファージ T4 および T7 DNA ポリメラーゼ、耐熱菌の DNA ポリメラーゼである。これらの酵素のうち、合成活性の特性については本講座“核酸 II、第 3 章 DNA 塩基配列決定法”で詳しく述べているので省略するが、組換え DNA 実験で末端の改変によく使われるのが T4 DNA ポリメラーゼである。この酵素は、ポリメラーゼ活性のほかに強い 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を有し (5'→3' 分解活性はもない)、一本鎖、二本鎖状態の末端いずれからも働く³⁾。しかし二本鎖を形成しているときの 3'→5' 分解活性は、合成反応の基質である dNTP が存在しないと

1) B. Lapeyre, F. Amalric, *Gene*, 37, 215 (1985).

2) D.C. Alexander, T.D. McKnight, B.G. Williams, *Gene*, 31, 79 (1984).

3) A. Kornberg, “DNA Replication”, Chap. 3, W.H. Freeman and Co., San Francisco (1979).

きにのみ起こる(一本鎖にはdNTPが存在していても働く).つまり、もあるdNTPを加えると、このヌクレオチドが取込まれる位置で分解と合成が平衡に達する。このような特性をうまく使い分けると、二本鎖DNAの末端構造を変えたり、一方の末端から選択的に欠損を入れることができるので、きわめて有用な酵素である。

2・4・2 末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdTase)¹⁾

TdTaseは、一本鎖あるいは二本鎖DNAの3'-OH末端にデオキシヌクレオチド(dNMP)を付加重合する酵素で、発見されたのはかなり古いが、精製が困難で反応条件の設定が難しいという問題のため従来あまり使われなかった。しかし重要性の増大とともに精製法や反応機構の研究が進み、市販標品の品質が非常によくなってきた。現在では扱いが難しい酵素ではなくなっている。反応条件の詳細についてはメーカーの指示に従うとして、一般的な性質を以下に述べる。

表2・1 TdTaseによる付加反応の特性^{†,a)}

付加反応		付加される塩基数	
付加塩基の種類	DNA鎖の3'-OH末端	Mn緩衝液	Co緩衝液
dA	3'突出	30~65	58~95
	平滑	—	141
	3'陥没	40	40
dT	3'突出	50~106	100
	平滑	42	167
	3'陥没	50	109
dC	3'突出	40~108	51~92
	平滑	15~30	43
	3'陥没	28~42	45
dG	3'突出	36~56	32~52
	平滑	14~33	19
	3'陥没	36~48	21

† pBR322 DNAをBgl I, Hinc II またはBamH Iで切断して3'突出末端、平滑末端、3'陥没末端をそれぞれ生成させ、dNTPを加えてTdTaseによる付加反応を行い、付加された塩基数をゲル電気泳動で分析したもの。

a) G. Deng, R. Wu, "Methods in Enzymology", ed. by R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, Vol. 100, p. 101, Academic Press, New York (1983).

1) G. Deng, R. Wu, "Methods in Enzymology", ed. by R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, Vol. 100, p. 96, Academic Press, New York (1983).

2. 組換え DNA 実験に用いる酵素

- 1) TdTase はランダム型の酵素なので、多くの DNA 末端に、より均一にホモポリマーを付加するには、当然ながら大過剰の酵素で反応を行うことが望ましい。しかしあまり大量に加えると、酵素標品のきょう雜物による反応阻害が起こることになる。
- 2) 付加反応には 2 倍の Mn^{2+} または Co^{2+} を要求するが、その効果は、表 2・1 に示すように、基質 DNA の 3'-OH 末端の構造および付加するヌクレオチドの種類によって大きく影響を受ける¹⁾。なお、3'-OH 末端としては 3 個以上のオリゴデオキシヌクレオチドが必要とされている。
- 3) 緩衝液としては、カコジル酸 (Na または K) 緩衝液 (pH 6.9~7.2, 100~200 mM) で高い活性が得られることから、反応にはもっぱらこの緩衝液が使用される。しかしカコジル酸標品のなかには反応を阻害するものがあるので、数種類の標品をチェックして高活性が得られるものを使用するか、メーカーに照会する方が無難である。通常、カコジル酸を KOH または NaOH で中和して使用するが、希釈すると pH が下がるので (pH 7.6 の 1 M 緩衝液を 10 倍希釈すると pH 6.9~7.0)，高濃度のものを希釈して使用する場合はチェックが必要である。

以上述べたように、TdTase による付加反応は DNA 末端の構造、反応液の組成、dNTP の種類によって大きく影響を受けるほか、どこの酵素標品を使うかによっても多少異なる結果が得られる。使用に当たっては、同一ロット番号の標品で得られたデータを参考にするか、標識 dNTP などを用いて付加条件をチェックしてから本実験に入る方が安全である。

2・4・3 エキソヌクレアーゼ^{2),3)}

歴史的には 3'→5' 分解型のヘビ毒ホスホジエステラーゼと 5'→3' 分解型の脾臓ホスホジエステラーゼが有名である。おもなものの特異性を表 2・2 に示したが、組換え DNA 実験で特によく用いられるものとしては、§2・4・1 で述べた T4 DNA ポリメラーゼと、大腸菌エキソヌクレアーゼ III および λ エキソヌクレアーゼがあげられる。大腸菌エキソヌクレアーゼ III は二本鎖を形成している DNA の 3'-OH 末端からのみ分解する。この特性を利用すれば、二本鎖 DNA の一方の末端からうまく欠損を導入することができる。つまり制限酵素を使って 3' 突出末端と 5' 突出末端を生成するように DNA

1) G. Deng, R. Wu, "Methods in Enzymology", ed. by R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, Vol. 100, p. 96, Academic Press, New York (1983).

2) B. Weiss, "The Enzymes", ed. by P.D. Boyer, Vol. 14, p. 203, Academic Press, New York (1981).

3) "核酸の化学 II (生化学実験講座 2)", 日本生化学会編, 第 1 部, 第 1 章, 東京化学同人 (1976).

表 2・2 DNAの修飾に繋用されるヌクレアーゼの特徴

酵素	特異性	分解産物	文献
クレアーゼ <i>E. coli</i> DNA ポリメラーゼ I	3'→5' ssDNA, dsDNA (3'-OH) (5') ←←← (3') 5'→3' dsDNA (5'-OH, 5'-P _{o~3}) →→→ ← (5')	pN (pN, oligo(N))	a, b
<i>E. coli</i> クレノウ酵素	3'→5' ssDNA, dsDNA (3'-OH) ←←← →→→	pN	a, b
T4 DNA ポリメラーゼ	3'→5' ssDNA, dsDNA (3'-OH) ←←← →→→	pN	c
<i>E. coli</i> エキソヌクレアーゼ I	3'→5' ssDNA, >dsDNA (3'-OH) ←←← →	pN	d
<i>E. coli</i> エキソヌクレアーゼ III	3'→5' dsDNA (3'-OH) ←←← →→→	pN	e
<i>E. coli</i> エキソヌクレアーゼ VII	3'→5' ssDNA 5'→3' ssDNA →→→ ←←←	oligo(N)	f
λ エキソヌクレアーゼ	5'→3' dsDNA (5'-P) ←←←	pN	g
エンドヌクレアーゼ			
DNase I	ssDNA, dsDNA (5') ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ (3') ↑ ↑ ↑ (5')	oligo(N) (-pN↑pN-)	h
<i>Micrococcus</i> ヌクレアーゼ	ssDNA, dsDNA ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑ ↑ ↑	oligo(N) (-pNp↑N-)	i
ヌクレアーゼ S1	ssDNA ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	pN	j, k
Bal 31 ヌクレアーゼ	ssDNA, >dsDNA ↓ ↓ ↓ → ← ↓ ↓ ↓ → ←	pN	l
ナタマメヌクレアーゼ	ssDNA, >dsDNA ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	pN	m
recBC型ヌクレアーゼ (ATP依存性 DNase)	線状 ssDNA, 線状 dsDNA ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑ ↑ ↑	oligo(N) (-pN↑pN-)	n

† 基質となるDNAについて一本鎖をss, 二本鎖をdsで示し, 分解速度が低い場合は>を付した。またエキソヌクレアーゼ活性を→→→(分解速度が低い場合は→), エンドヌクレアーゼ活性を↑↓で示した。

- a) A. Kornberg, "DNA Replication" p. 101, Freeman & Co., San Francisco(1980).
- b) C.P. Hartman, D. Rabussay, "Gene Amplification and Analysis", ed. by J.G. Chirikjian, T.S. Papas, Vol. 2, p.17, Elsevier, Amsterdam(1981).
- c) I.R. Lehman, "Methods in Enzymology", ed. by L. Grossman, K. Moldave, Vol. 29, p. 46, Academic Press, New York (1974).
- d) I.R. Lehman, "The Enzymes", ed. by P.D. Boyer, Vol. 4, p.251, Academic Press, New York (1971).

2. 組換 DNA 実験に用いる酵素

- 酵 (さき)
- g) Rogers, B. Weiss, "Methods in Enzymology", ed. by L. Grossman, K. Moldave, Vol. 201, Academic Press, New York (1980).
 - Chase, L.D. Vales, "Gene Amplification and Analysis", ed. by J.G. Chirikjian, エキソヌ Papas, Vol. 2, p. 147, Elsevier, Amsterdam (1981).
 - g) J.W. Little, "Gene Amplification and Analysis", ed. by J.G. Chirikjian, T.S. Papas, Vol. 2, p. 135, Elsevier, Amsterdam (1981).
 - h) S. Moore, "The Enzymes", ed. by P.D. Boyer, Vol. 14, p. 281, Academic Press, New York (1981).
 - i) C.B. Anfinsen, P. Cuatrecasas, H. Taniuchi, "The Enzymes", ed. by P.D. Boyer, Vol. 4, p. 177, Academic Press, New York (1971).
 - j) G.W. Rushizky, "Gene Amplification and Analysis", ed. by J.G. Chirikjian, T.S. Papas, Vol. 2, p. 205, Elsevier, Amsterdam (1981).
 - k) V.M. Vogt, "Methods in Enzymology", ed. by L. Grossman, K. Moldave, Vol. 65, p. 248, Academic Press, New York (1980).
 - l) H.B. Gray, T.P. Winston, J.L. Hodnett, R.J. Legerski, D.W. Nees, C. Wei, D.L. Robberson, "Gene Amplification and Analysis", ed. by J.G. Chirikjian, T.S. Papas, Vol. 2, p. 169, Elsevier, Amsterdam (1981).
 - m) M. Laskowski, "Methods in Enzymology", ed. by L. Grossman, K. Moldave, Vol. 65, p. 263, Academic Press, New York (1980).
 - n) K.N.T. Muskatte, S. Linn, "The Enzymes", ed. by P.D. Boyer, Vol. 14, p. 233, Academic Press, New York (1981).

を切出すと、5' 突出末端の方からだけ分解が進行するからである¹⁾.

λエキソヌクレアーゼは数少ない 5'→3' 分解型酵素の一つであるが、λ溶原菌の誘導によって調製することができるため標品の純度が高く、また 5'-P 末端に特異的であることから 5' 末端からの特異的分解によく使用される酵素である。

2・4・4 エンドヌクレアーゼ^{2),3)}

おもなものの特性を表2・2に示したが、一本鎖、二本鎖ともに働く酵素として DNase I と *Micrococcus* ヌクレアーゼがよく知られている。いずれもオリゴヌクレオチドを生成するが、前者は 5'-P を、後者は 5'-OH を生ずるように切断する。一本鎖に特異的なものとしてはヌクレアーゼ S1, Bal 31 ヌクレアーゼ、ナタマメ (mung bean) ヌクレアーゼがよく知られている。いずれも、わずかではあるが二本鎖DNAも分解するが、きょう雑物によるのではなくて末端部分あるいは内部でのヘリックス構造の部分開裂によるとされている。これらの酵素は、ヌクレアーゼ S1 とナタマメヌクレアーゼが Zn²⁺ を、Bal 31 ヌクレアーゼが Ca²⁺ を要求するなど、特性が通常の酵素とかなり異なるので、注意が必要である。

1) C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, *Gene*, 33, 103 (1985).

2) “核酸の化学Ⅱ(生化学実験講座2)”, 日本生化学会編, 第1部, 第1章, 東京化学同人 (1976).

3) “The Enzymes”, ed. by P.D. Boyer, Vol. 14, Section II, Academic Press, New York (1981).

エンドヌクレアーゼではあるが異なった作用様式を示すものに *recBC* 型酵素がある¹⁾。この型の酵素は、最初に *Micrococcus lysodiekticus* から分離され²⁾、反応に ATP を要求することから ATP 依存 DNase とよばれた。その後、多くの細菌や真核生物にも発見され、また *recBC* 遺伝子の産物と推定されることから、*recBC* 型酵素ともよばれている。特徴は、環状二本鎖には作用せず、末端を有する一本鎖、二本鎖 DNA のみを断片化するユニークな活性をもつ。エキソヌクレアーゼのように末端方向から分解が進むが、産物はオリゴヌクレオチドである。環状二本鎖 DNA から線状二本鎖 DNA を除くのに使われている³⁾。

2・5 DNA の結合に用いる酵素⁴⁾

大腸菌系で λ ファージの付着末端 (cohesive end) を結合する酵素として最初に発見されたが、その後 DNA 上に生じた一本鎖切断 (ニック) の修復に関与する酵素として広く生物界に分布することがわかった。この酵素が脚光を浴びるようになったのは、組換え DNA 実験で制限酵素切断により生じた付着末端を結合するのに使われるようになってからである。大腸菌自体の酵素と、大腸菌ファージ T4 の酵素があり、それぞれクローニングされ、遺伝子工学的手法により純度の高い標品がつくられている。両者とも 3'-OH 末端と 5'-P 末端を結合して 3'-5' リン酸ジエステル結合を形成するが、いくつかの点で性質が異なる。

大腸菌 DNA リガーゼはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)⁵⁾ を、T4 DNA リガーゼは ATP⁶⁾ を補酵素として要求し、前者は付着末端のみを結合するのにに対して、後者は平滑末端 (blunt end) も結合することができる。このことは遺伝子工学で非常に重要な意義をもっている。つまり T4 DNA ポリメラーゼを使えば、どのような構造の末端も DNA ポリメラーゼ反応による修復合成、あるいは一本鎖特異的ヌクレアーゼ作用などにより平滑末端に変えることにより、うまく結合することができるからである。逆に大腸菌 DNA リガーゼを用いれば、平滑末端同士の結合を排除することが

- 1) K.N.T. Musavitch, S. Linn, "The Enzymes", ed. by P.D. Boyer, Vol. 14, p. 233, Academic Press, New York (1981).
- 2) Y. Tsuda, B.S. Strauss, *Biochemistry*, 3, 1678 (1964).
- 3) H. Yamagishi, T. Tsuda, S. Fujimoto, M. Toda, K. Kato, A. Maekawa, M. Umeno, M. Anai, *Gene*, 26, 317 (1983).
- 4) M.J. Engler, C.C. Richardson, "The Enzymes", ed. by P.D. Boyer, Vol. 15, p. 3, Academic Press, New York (1982).
- 5) B.M. Olivera, I.R. Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 57, 1700 (1967).
- 6) B. Weiss, C.C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 57, 1021 (1967).

かくはんしながら少量ずつ加え、均一な懸濁液とする。

[DNA の精製]

- 4) 上記 3) の懸濁液を 50°C で 15 時間保温する。
- 5) フェノール-クロロホルム処理を 3 回行ったのち、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)-10 mM EDTA に対して透析する。
- 6) RNase A を 5 µg/ml に加え、37°C で 30 分間保温し、SDS とプロテイナーゼ K をそれぞれ 0.5% および 0.2 mg/ml に加えて 37°C で 2 時間以上保温する。
- 7) フェノール-クロロホルム処理を 2 回行い、n-ブタノールで十分に濃縮したのち、TE に対して透析する。この溶液を DNA 溶液として以降の操作に用いる。

5・4・2 ゲノム DNA の切断と分画

十分に高分子のゲノム DNA が得られたらそれを無作為に切断し、ベクターに組みめる大きさ（通常 15~20 kbp）の DNA を分画する。完全な遺伝子ライブラリーとするには、DNA を無作為に切断することが重要であり、古くは機械的切断（shearing）または、平滑末端（blunt end）を生じる 2 種類の 4 塩基配列認識制限酵素による部分分解が利用された。しかし、これらの方法は、酵素処理などの多くの段階を必要とし、効率も悪くなる。そこで、簡単な方法として単一酵素による部分分解法が用いられることが多い。ただし、この場合は、ゲノム上に制限酵素認識配列がまったくランダムには存在しないので（たとえば、高頻度の反復配列領域など）、たとえ完全分解してもクローニングできない配列領域が残ることがある。特に、6 塩基配列認識制限酵素を使用した場合は注意を要し、異なる制限酵素を用いて作製したライブラリーを併用することを考えておく必要がある。最近ではさまざまな *Bam*H I 部位をもつベクター（これらは、さらにポリリンカー部位をもつため、ほかの数種の制限酵素にも使用できる）が開発され、*Bam*H I と同じ末端を生じる 4 塩基配列認識制限酵素の *Mbo*I または *Sau*3A I による切断を利用することによって、上記の問題点をかなり改善することができるようになっている。以下には、単一酵素による部分分解を利用した遺伝子ライブラリー作製の例を示す。

【実験例 2】 *Eco*R I による部分分解

- 1) ゲノム DNA の部分分解は酵素量または反応時間を変化させて行う。いずれの場合も、まずゲノム DNA が完全に分解される条件を決定する。ゲノム DNA 5 µg に、10 単位の *Eco*R I を 37°C で作用させる。10 分ごとに反応液の一部を取り、EDTA を 10 mM になるように加えて反応を停止させる。0.5% アガロースゲルで